



Mikrobiel vandkvalitet i rentvandsbeholdere efter inspektion og rensning

Christensen, Sarah Christine Boesgaard; Esbjørn, Anne; Møllerup, Finn; Musovic, Sanin; Klümper, Uli; Albrechtsen, Hans-Jørgen

Publication date:
2014

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Christensen, S. C. B., Esbjørn, A., Møllerup, F., Musovic, S., Klümper, U., & Albrechtsen, H.-J. (2014). *Mikrobiel vandkvalitet i rentvandsbeholdere efter inspektion og rensning*. DTU Miljø.
<http://www.vandcenter.dk/viden/forskningsprojekter/mikrobiel-vandkvalitet>

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Mikrobiel vandkvalitet i rentvandsbeholdere efter inspektion og rensning



Sarah C.B. Christensen, DTU Miljø^a
Anne Esbjørn, VandCenter Syd^b
Finn Møllerup, VandCenter Syd^b
Sanin Musovic, DTU Miljø^a
Uli Klümper, DTU Miljø^a
Hans-Jørgen Albrechtsen, DTU Miljø^a

^aDanmarks Tekniske Universitet, DTU Miljø

^bVandCenter Syd

Indhold

Indhold	1
Forord.....	2
Resumé.....	3
1. Introduktion.....	4
2. Formål.....	5
3. Baggrund.....	6
3.1. <i>Mikrobiel vandkvalitet.....</i>	6
3.1.1. Kimtalsbestemmelse	6
3.1.2. Indikatororganismer.....	6
3.1.3. Patogener	7
3.1.4. Adenosin Trifosfat (ATP).....	7
3.2. <i>Erfaringer fra VandCenter Syd.....</i>	7
3.2.5. Dalum	7
3.2.6. Lunde.....	7
3.2.7. Sammenligning	8
4. Materialer og metoder	9
4.1. <i>Beskrivelse af Hovedværket.....</i>	9
4.2. <i>Procedurer og prøvetagning</i>	10
4.2.1. Procedurer ved nedlukning og opstart.....	10
4.2.2. Prøvetagning	11
4.3. <i>Analyser.....</i>	13
5. Resultater	15
5.1. <i>Bakteriemålinger</i>	15
5.1.1. Fækale indikatorer og patogener	16
5.1.2. Online måling af total celletal	16
5.1.3. Afgangsvand fra filter	17
5.1.4. Eftervækstpotentiale.....	18
5.1.5. Karakterisering af sediment og biofilm	20
5.1.6. Turbiditet og NVOC (non volatilt organisk kulstof)	21
5.1.7. DNA-analyser.....	21
6. Konklusion	23
7. Anbefaling til procedure for inspektion og rensning af rentvandsbeholdere	24
8. Referencer	25
Bilag 1.....	26
Bilag 2.....	28
Bilag 3.....	31

Forord

Projektet er udført i samarbejde mellem VandCenter Syd og DTU Miljø i foråret og sommeren 2013. Alle prøver er taget på VandCenter Syds hovedværk, Hovedværket, i rentvandsbeholder 1 og 2. Laboratoriarbejdet er udført på DTU Miljø.

Tak til Charlotte B. Corfitzen, Óluva K. Vang, Lene K. Jensen og Sabrina Nedell for assistance i mikrobiologisk laboratorium. Sinh Hy Nguyen takkes for assistance med metal og kulstofanalyser.

Henrik Holst fra VandCenter Syd har været en stor hjælp med stop og idriftsætning på Hovedværket samt indsamling af prøver i beholderne.

Grundfos har stillet en prototype til partikelkvantifikation til rådighed ved prøvetagningen i beholder 2 samt bidraget med databehandling.

Resumé

Der måles ofte forhøjede kimtal ved idriftsætning af rentvandsbeholdere efter inspektion. Årsagen hertil kendes ikke, og VandCenter Syd har derfor i samarbejde med DTU Miljø undersøgt den mikrobielle vandkvalitet i forbindelse med inspektion og rensning af to rentvandsbeholdere på Hovedværket i Odense.

Projektets formål var at undersøge, om måling af forhøjede kimtal skyldes naturligt forekommende drikkevandsbakterier eller forurening tilført beholderne i forbindelse med rensning og inspektion.

Der blev udtaget prøver før, under og efter beholderrensning for at kvantificere vækstgrundlaget i beholderne samt at karakterisere, hvilke bakterier der var dominerende. Der blev udtaget vandprøver umiddelbart før nedtømning, umiddelbart efter beholderen var fyldt og idriftsat og fire dage frem. Der blev udtaget sedimentprøver fra bunden af beholderen efter nedtømning, og skrab af biofilm på beholderens gulv blev taget efter spuling af beholderen.

Beholdernedtømning og -fyldning forløb over 3 døgn. Beholderne blev nedtømt til 40-80 cm og stod natten over. Det resterende vandvolumen blev pumpet bort med dykpumpe den følgende morgen, hvorefter sedimentprøver fra tankens bund blev taget. Dagen efter blev beholderen inspiceret og spulet, hvorefter biofilmprøven blev taget. Påfyldning af vand begyndte næste morgen.

Grænseværdien for kimtal₂₂, eller andre mikrobiologiske parametre, blev ikke overskredet på noget tidspunkt i projektet. Umiddelbart efter idriftsætning målt kimtal₂₂ på max 10 CFU/ml (Colony Forming Units) i begge beholdere. Koncentrationerne faldt til under 1 CFU/ml i begge tanke indenfor 24 timer. Over de følgende fire dage forblev målingerne på et lavt niveau. Kimtal₃₇ var lavere end 2 CFU/ml på alle tidspunkter. På et mere næringsfattigt medie, R2A, der er bedre tilpasset drikkevandsbakterier, blev der målt kimtal₂₀ værdier på ca. 200 CFU/ml ved idriftsætning af beholderne. Disse niveauer faldt ligesom for kimtal₂₂ og kimtal₃₇ i løbet af 24 timer, men var dog stadig på et svagt forhøjet niveau på dag 4 i forhold til niveauet inden rensning. De ikke dyrkbare bakterier blev inkluderet i undersøgelsen ved at måle ATP (Adenosin Trifosfat) i vandet. ATP er et energi-bærende molekyle, der findes i alle levende celler. ATP-koncentrationen i afgangsvandet fra beholderne, umiddelbart efter idriftsætning, var høj i forhold til koncentrationen af dyrkbare bakterier, hvilket kan betyde, at bakterier fra sandfilteret, såsom nitrificerende bakterier, der ikke måles med kimtal₂₀, kimtal₂₂ eller kimtal₃₇, er til stede i vandet. Der blev på intet tidspunkt målt patogene (sygdomsfremkaldende) bakterier eller indikatororganismer i vand, sediment eller biofilm.

Der blev målt forhøjede koncentrationer af mikrobielt tilgængeligt kulstof, målt som eftervækstpotentiale, i vandet efter nedtømning af beholderne. Sedimentet fra beholderne bestod hovedsageligt af kalk, kvartssand, jern, mangan og organisk kulstof.

Ved hjælp af DNA analyser blev det undersøgt, om de dominerende bakteriegrupper i vandet efter idriftsætning var de samme grupper, der var til stede inden rensning, eller om der var tale om en ny population, der var blevet introduceret ved inspektion og rensning. Analyserne viste, at de samme bakteriegrupper var dominerende både før nedtømning og efter rensning og idriftsætning. Ydermere blev bakterier fra filteret deriblandt *Nitrospira* sp. ledt fra filtre til rentvandsbeholder og videre ud i forsyningsnettet, hvor de blev genfundet frem til sidste prøvetagningsdag i afgangsvandet. Enkelte bakteriegrupper, som typisk lever fasthæftet på substrater, blev kun fundet i sediment og biofilm.

1. Introduktion

Dansk drikkevand baseres på grundvand, der efter oppumpning som hovedregel alene iltes og filtreres igennem et sandfilter. Vandet distribueres uden anvendelse af hygiejniske barrierer, såsom klor, i rentvandsbeholdere og i distributionsnettet ud til forbrugerne. Der er derfor fokus på at monitorere den mikrobielle kvalitet for indikatorer for fækal forurening samt for vækst af heterotrofe bakterier i vandet generelt. Forhøjede koncentrationer af heterotrofe bakterier, udtrykt som kimtal, indikerer en ændring i vandets kvalitet fx eftervækst eller forureninger.

Rentvandsbeholdere fungerer som opbevaring for det behandlede vand og kan også fungere som højdebeholdere, der forsyner lavereliggende områder. Vandets opholdstid i rentvandsbeholdere kan variere betydeligt. Da der ikke er lovgivet om frekvens og procedurer for rensning af rentvandsbeholdere, varierer også dette i høj grad fra forsyning til forsyning.

Med tiden udfælder jern og mangan i beholderne. Derved dannes såkaldt drikkevandssediment med et højere indhold af organisk kulstof, bakterier og enkeltcellede organismer end i vandfasen. Ved rensning af beholderne fjernes drikkevandssedimentet hos VandCenter Syd ved at nedtømme beholderen og spule gulvet. Samtidig inspiceres beholderen for utætheder og revner, der ellers vil udgøre en risiko i forhold til indtrængen af vand, jord, fækalier og lignende.

Procedurer omkring nedtømning og rensning af rentvandsbeholdere varierer fra forsyning til forsyning, da der ikke findes en standardiseret procedure. I nogle tilfælde klores beholderne efter inspektion og rensning, men dette søges undgået, hvis der ikke er indikationer på forurening, da selve klorbehandlingen giver anledning til eftervækst af bakterier i beholderne. Forløbet, der beskrives i denne rapport, er standard rensning og inspektion, der under normale omstændigheder hos VandCenter Syd ikke giver anledning til klorbehandling.

I denne rapport gør vi rede for de procedurer, der hidtil har været fulgt i VandCenter Syd og evaluerer effekter på vandkvaliteten. Vi udarbejder en procedure, der er optimeret både i forhold til at opnå den bedst mulige vandkvalitet og rent praktisk være gennemførlig. Gennem to prøvetagningskampagner evalueres proceduren, og endelig kommer vi med anbefalinger til fremtidige procedurer.

2. Formål

Projektets formål var at afdække årsagerne til, at der ved genopstart af rentvandsbeholdere ofte måles forhøjede kimtal på trods af, at VandCenter Syd følger strikse procedurer mht. hygiejne. Da forhøjede kimtal normalt anvendes som indikator for forurening eller eftervækst, undersøges det, om der er tale om udefrakommende bakterier eller naturligt forekommende drikkevandsbakterier, der ikke udgør en sundhedsrisiko.

Baseret på resultaterne udvikles en "best practice" procedure for inspektion, rensning og opstart af rentvandsbeholdere.

Hypoteserne, der ønskes undersøgt er, hvorvidt der ved beholderrensning:

- sker en øget vækst af almindeligt forekommende drikkevandsbakterier pga. øget næring frigivet ved rensning
- frigives bakterier til vandet, når sediment og biofilm hvirvles op
- måles forhøjede bakteriekoncentrationer pga. forurening fra inspektion eller rensning
- måles forhøjede kimtal, fordi eftervækstpotentialet, der under normale omstændigheder udløses i ledningsnettet, udnyttes allerede i rentvandsbeholderen
- skylles forhøjede koncentrationer af filterbakterier ind i rentvandsbeholderen (som dog ikke nødvendigvis giver anledning til forhøjede kimtal)

For at besvare disse spørgsmål blev to rentvandsbeholdere på Hovedværket hos VandCenter Syd i Odense analyseret for at kvantificere bakterier og mikrobielt vækstpotentiale samt identificere dominerende bakteriegrupper før, under og efter rensning og inspektion. DNA analyser blev brugt til at identificere dominerende bakteriegrupper samt at sammenligne bakteriepopulationer i sandfiltre, sediment, biofilm og afgangsvand før og efter rensning af beholderne.

3. Baggrund

3.1. Mikrobiel vandkvalitet

Da dansk drikkevand ikke kloses ved normal produktion og distribution, stilles der høje krav til vandets mikrobielle kvalitet. Dansk lovgivning (Drikkevandsbekendtgørelsen 2011) stiller således strengere krav end de, der er opstillet i EU's drikkevandsdirektiv (EU 1998), og der monitoreres løbende for ændringer i vandets kvalitet og for indikatorer for fækale forureninger. En normal kontrol hos VandCenter Syd af afgangsvand fra vandværk inkluderer kimtalsbestemmelse ved 22 og 37° C samt analyse for *E. coli* og andre coliforme bakterier (Tabel 1).

Tabel 1. Kvalitetskrav til mikrobiologiske parametre i dansk drikkevand (Drikkevandsbekendtgørelsen 2011).

		Værdi ved afgang fra vandværk	Værdi ved indgang til ejendom
Coliforme bakterier	Pr. 100 ml	Ikke målelig	Ikke målelig
<i>E. coli (Escherichia coli)</i>	Pr. 100 ml	Ikke målelig	Ikke målelig
Kimtal ved 22° C	Pr. ml	5	20
Kimtal ved 37° C	Pr. ml	50	200

3.1.1. Kimtalsbestemmelse

Kimtalsbestemmelse er en metode til at kvantificere heterotrofe bakterier i en prøve. Heterotrofe bakterier karakteriseres ved at de ikke selv kan fikse kulstof men anvender organisk kulstof som fødekilde. Kimtallet angiver antallet af bakterier, der er i stand til at danne en koloni på et vækstmedie som fx gærestrakt agar eller R2A agar. Da ikke alle levende bakterier vil vokse på organiske vækstmedier, er det generelt kun en lille andel af de levende bakterier, der måles ved kimtalsbestemmelse. Mens der findes naturligt forekommende bakterier i drikkevand, der måles ved kimal22 metoden, kan forhøjede kimal bruges til at påvise forureninger. Forhøjede kimal forekommer dog også ved ændrede driftsforhold, hvor næring eller bakterier fra biofilm eller drikkevandssediment frigives. Kimal37 bruges til at kvantificere bakterier, der kan vokse ved legemstemperatur og dermed potentielt være sygdomsfremkaldende.

3.1.2. Indikatororganismer

E. coli og total coliforme bakterier anvendes som indikatorbakterier for forurening af drikkevand. Forurening kan enten introduceres direkte ved indtrængen af spildevand eller overfladevand i utætte rentvandsbeholdere eller i rørsystemerne ved brud og ved lavt tryk. Forureninger kan også forekomme som følge af reparationsarbejder. Coliforme bakterier findes i dyrs og menneskers tarmsystem og forekommer derfor i fækale forureninger, men inkluderer imidlertid også flere forskellige bakterieslægter, der forekommer naturligt i jord og overfladevand. Coliforme bakterier er således ikke en entydig indikator for fækal forurening, hvorimod *E. coli* udelukkende findes i dyrs og menneskers tarmsystem og ofte betragtes som den bakterie, der bedst opfylder kravene til en indikatororganisme for fækal forurening (Edberg et al. 2000). Enterokokker (bakterier af slægten *Enterococcus*) kan også anvendes som indikatorer for fækal forurening, da de findes i tarmsystemet hos dyr og mennesker.

3.1.3. Patogener

En række patogene bakterier, protozoer og vira kan introduceres ved fækale forureninger. Patogenerne kan give anledning til sygdom – i de fleste tilfælde mave-tarm-sygdomme. Mikroorganismer, som især kan være knyttet til drikkevandsrelateret sygdom, er blandt andet: *Campylobacter*, *Salmonella*, verotoksinproducerende *E. coli* (VTEC), *Cryptosporidium*, *Giardia*, norovirus og Hepatitis A virus (Miljøstyrelsen 2005). De har som hovedregel en kortere overlevelsestid end indikatororganismerne og bliver i mange tilfælde ikke registreret.

3.1.4. Adenosin Trifosfat (ATP)

Adenosin Trifosfat er et energibærende molekyle, der findes i alle levende celler. Måling af ATP er således en ikke-selektiv hurtigmetode, som bestemmer al celleaktivitet, men som ikke direkte kan omsættes til bakterieantal. I princippet måles kun aktive celler, men ATP kan frigøres til vandfasen ved celledød og høj celleaktivitet, hvorfor der skelnes mellem total ATP (ufiltreret) og frit ATP (filtreret).

3.2. Erfaringer fra VandCenter Syd

VandCenter Syd har ikke tidligere haft faste procedurer for, hvor længe en beholder måtte stå tom efter rensning, eller hvornår en beholder blev sat i drift efter påfyldning påbegyndtes. Som hovedregel stod en beholder tom natten over efter spuling, hvorefter fyldning påbegyndtes næste morgen, så vandstanden løbende kunne monitoreres.

Ved opstart af beholdere efter tømning og rensning målttes ofte overskridelser af Kimtal22 værdier, senest i Dalumværket i januar 2013 og Lundeværket i oktober 2012. Erfaringerne fra de to værker beskrives kort i det følgende:

3.2.5. Dalum

Nedpumpningen af beholderen påbegyndtes d. 22. januar 2013 om morgenen kl. 9, og beholderen stod tom til d. 1. februar, hvor opfyldning påbegyndtes kl. 9.35. Vandet blev sendt til forbrugere fra kl. 11.10. Vandstanden var på 2,3 m kl. 11.40, da der blev udtaget en prøve med kimtal22 på 1100 CFU/ml og kimtal37 på 5 CFU/ml. Efter tre dage (4. februar) var kimtal22 på 11 CFU/ml, og der var ingen kimtal37. Rentvandsbeholderen i Dalum har et areal på 179 m² (12,0 m x 14,9 m). Der er ingen skyllerende i beholderen. Der var filtergrus på bunden af beholderen og dermed mere færdsel i beholderen end ved en normal tømning samt brug af værktøj til at skille rør for at fjerne gruset. Derudover blev der rensset med højtrykspuler (dog med lavt til moderat tryk) i stedet for almindelig skylning.

3.2.6. Lunde

Lundeværket har to rentvandsbeholdere, hvor der i begge blev målt mindre kimtal22-overskridelser efter rensning og inspektion.

Beholder 1 var nedtømt d. 9. oktober 2012 kl. 14, hvorefter ilttings- og rentvandsbeholder blev rensset. Om formiddagen d. 10. oktober kl. 11 påbegyndtes fyldning. Efter fire timer havde beholderen nået et niveau på 1,75 m. En prøve med kimtal22 på 61 CFU/ml blev taget d. 11. oktober kl. 11.45, ca. 21 timer efter beholderen var blevet fyldt. Kort før prøvetagning blev et lille volumen vand sendt til forbrugere (1-1,5 m³/t). Reel opstart af udsending til distributionsnettet var kl. 12.30.

Efter fire dage (15. oktober) var kimtal22 på 4 CFU/ml. Der blev ikke på noget tidspunkt målt overskridelse af kimtal37. Rentvandsbeholder 1 i Lunde har et areal på 205 m² (19,0 m x 10,8 m). Der er en skyllerende.

Det er usikkert præcist hvornår beholder 2 blev tømt, da niveaumåleren i rentvandsbeholderen har været ude af drift. Beholder 2 blev tømt og rengjort indenfor perioden fra d. 10. til d. 15. oktober 2012. Den 16. oktober ca. kl. 7.15 startede påfyldning. En prøve med kimtal22 på 60 CFU/ml og kimtal37 på 1 CFU/ml blev taget d. 16. oktober kl. 9.45. Rentvandsbeholder 2 i Lunde har et areal på 205 m² (19,0 m x 10,8 m). Der er en skyllerende.

3.2.7. Sammenligning

Forskelle fra de beskrevne tilfælde på Lundeværket og Dalumværket til dette studie af Hovedværkets beholdere 1 og 2 er bl.a., at der ved Hovedværket har været øget fokus på hygiejne pga. bevidstheden om undersøgelsen. Derudover er perioder med stilstand i beholderen minimeret på Hovedværket, hvorimod Dalum har stået nedtømt i 10 dage og Lunde, beholder 1 har stået vandfyldt i 21 timer. Det er usikkert, hvor længe beholder 2 i Lunde stod tømt, men det forventes at beholderen har været tømt i mellem 1-6 dage inden påfyldning er påbegyndt. Dalumværket skilte sig desuden ud fra de øvrige vandværker ved, at der skulle fjernes filtergrus på bunden, der blev anvendt højtryksrenser og dermed blev brugt andre metoder end normalt.

4. Materialer og metoder

4.1. Beskrivelse af Hovedværket

Hovedværket er et af VandCenter Syds syv vandværker og blev oprindeligt opført i 1853. Vandværket, der står i dag, blev nybygget i 1985. VandCenter Syd leverer drikkevand til 156.000 forbrugere svarende til godt 9 mio. m³ vand årligt via et distributionsnet på ca. 1000 km drikkevandsledninger. Udover rentvandsbeholdere på vandværkerne er der to højdebeholdere i systemet. Hovedværket producerer knap 1/3 af VandCenter Syds drikkevand med en udpumpning på lidt under 3 mio. m³/år (ca. 8600 m³/døgn). Hovedværket er et konstantlastværk – med jævn indvinding og kører normalt med en stabil drift 365 dage om året.

Hovedværket har to rentvandsbeholdere med et samlet max. volumen på ca. 3000 m³ (Tabel 2). Der er adgang til beholderne via separate dæksler på beholdernes overside (Figur 1). De to beholdere vil under normal drift være forbundne, således at vandniveauet udlignes. Beholder 1 er dog dybere end beholder 2, og derfor vil man normalt se en forskel i niveaumålene på omkring 60 cm.



Figur 1. Nedgang til beholder 1, Hovedværket på VandCenter Syd.

Tabel 2. Data for beholder 1 og 2 på Hovedværket, VandCenter Syd.

	Beholder 1	Beholder 2
Areal	315 m ²	522 m ²
Beholderhøjde	3,40 m	3,05 m
Max vol.	1071 m ³	1592 m ³
Vandniveau før nedtømning	2,1 m	1,4 m
Volumen før nedtømning	662 m ³	731 m ³
Vandniveau ved idriftsætning	2,1 m	1,0 m
Volumen ved idriftsætning	662 m ³	522 m ³
Flow ud af beholder ved idriftsætning	Ca. 260 m ³ /t	Ca. 260 m ³ /t
Nedtømningsniveau uden dykpumpe	0,8 m	0,4 m
Sugesump/pumpesump	Ja	Ja
Skyllerende	Nej	Nej

Hovedværket havde 8 aktive borer i forsommeren 2013. I perioden for prøvetagning i beholder 1 kom vandet fra boring E257, E225, E30 og BB288, og boring E233, E225, E30 og BB288 var i drift i perioden for prøvetagning i beholder 2. Vandbehandlingen omfatter beluftning med indblæsning og enkeltfiltrering i flermediefiltre. Der er en filterserie til hver beholder bestående af seks filtre, alle med afgang til et fælles rør, der leder til en rentvandsbeholder. Filterafgang vest (filter 7-12) leder til beholder 1, mens filterafgang øst (filter 1-6) leder til beholder 2. Filterserierne får tilført samme råvand. Vandet fra rentvandsbeholder 1 og 2 ledes til et fælles hovedrør til distributionsnettet.

4.2. Procedurer og prøvetagning

4.2.1. Procedurer ved nedlukning og opstart

En beholder ad gangen blev lukket ned, tømt, inspiceret og spulet ved normalt tryk fra brandhane. Beholder 1 blev analyseret i perioden 2. – 9. april 2013. Efter en periode med almindelig drift af begge beholdere blev procedurerne gentaget for beholder 2 i perioden 17. – 24. juni 2013. Detaljerede procedurer er beskrevet i Bilag 1.

Nedtømning af beholder 1: Under nedtømningen blev der lukket for indløb og udløb fra beholder 2. Først blev alle borer stoppet, derefter filtrene og så blev beholder 1 tømt ved at pumpe vandet ud på distributionsnettet ud til forbrugerne. I ca. 1 time var der derfor ingen produktion på Hovedværket. Før nedtømning af beholder 1 var den samlede afgang fra Hovedværket på 470 m³/t. Normaldriften er på 350-400 m³ i timen på hovedværket med halvdelen i hver beholder, men produktionen var i denne periode øget pga. nedlukning af Lindvedværket. I beholder 1 blev der ved automatisk nedtømning nået et niveau på 0,8 m, så resten foregik ved dykpumpe den følgende morgen, og vandet blev ledt til kloak.

Beholderen blev fyldt ved normal hastighed til normal beholdning, for at undgå øget belastning af filtrene. Normalt udlignes vandniveauet med den anden beholder, når en beholder sættes i drift igen. På den måde vil vandet så være "fortyndet op med vand fra normal drift". Det blev undgået ved prøvetagningerne, så vi kun målte mikrobiel kvalitet på vand fra den ønskede beholder.

Taphanen, hvorfra vandprøverne blev taget, sidder på det fælles afgangsrør fra beholder 1 og 2, så beholder 2 var lukket under prøvetagning, men kørte mens beholder 1 blev tømt, rensat og inspiceret.

I beholder 1 blev prøven fra beholderafgang taget, da vandniveauet var stort set det samme som før nedtømning. Flowet ud af Hovedværket var stadig halveret under prøvetagning, da kun beholder 1 var i drift, så vi var sikre på, at det ikke var blandet med vand fra beholder 2. Fra tidspunktet for idriftsætning af beholder 1 blev beholder 2 igen taget ud af drift, så vi alene monitorerede kvaliteten af vand fra beholder 1 i de følgende dage.

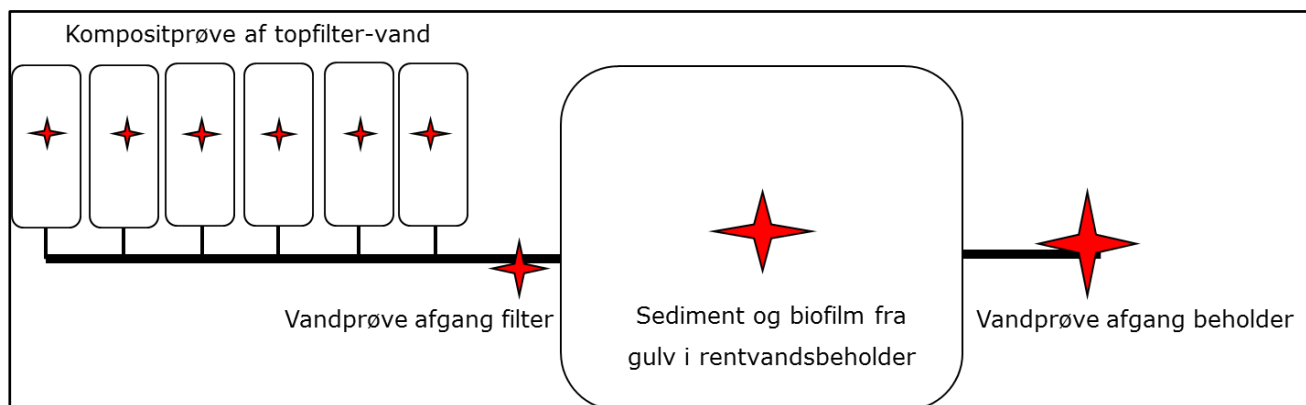
Vandet blev udskiftet indenfor ca. 2½ time i beholder 1.

Nedtømning af beholder 2: Samme procedurer og tidsskema som ved beholder 1 blev fulgt. Der blev dog opsat et telt, som overdækning ved nedgangen til beholder 2, hvilket ikke var tilfældet ved beholder 1. Forskelle på vandhøjde og volumen i forhold til beholder 1 ses i Tabel 2.

Vandet blev udskiftet indenfor ca. 2 timer i beholder 2.

4.2.2. Prøvetagning

Vandprøver blev taget fra en taphane ved beholderafgang og ved filterafgang (Figur 2).



Figur 2. Prøvetagningssteder (røde stjerner) på Hovedværket, VandCenter Syd.

Ilt, pH, temperatur og ledningsevne blev målt ved at tilslutte elektroder i serieforbindelse. Ved at monitorere ændringer i disse værdier kunne det bekræftes, hvorvidt der blev målt på vand fra beholder 1 eller 2 eller blandingsvand. Inden prøvetagning blev der skyllet fra prøvetagningshanen ved max. flow i 5 min., for at evt. løs biofilm blev fjernet inden prøvetagning. Der blev skruet ned til et stabilt roligt flow i 1 min., hvorefter prøven blev taget.

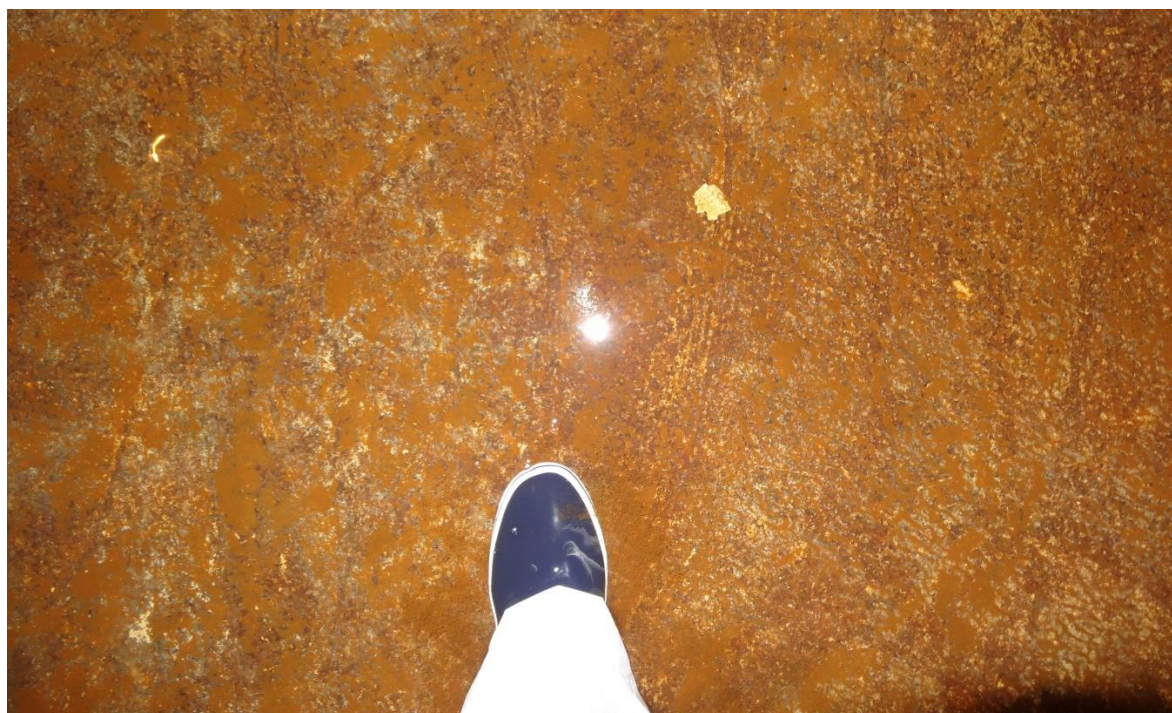
Vandprøver blev taget i blue cap flasker (0,5 eller 1,0 liter) der forinden var syrevaskede og glødede (18 timer ved 550 °C). Lågene var syrevaskede og varmede ved 120 °C i 18 timer. Til DNA analyserne blev ca. 2 L vandprøve taget i DNA-frie 4 L fryseposer. Alle prøver blev straks efter prøvetagning transporteret til DTU Miljø i køletasker og analyseret samme dag.

Derudover blev der ved prøvetagning fra beholder 2 taget prøver af vandet, der lå over sandet i sandfiltrene (Figur 3). Prøven blev taget med et prøvetagningsbæger fastgjort på et skaft. Prøven var en kompositprøve af vand fra alle seks filtre (filter 1-6).



Figur 3. Vandprøver fra sandfilter 1-6 (øst) ved beholder 2 udtages.

Sedimentprøver blev taget fra bunden af beholder 1 og 2 før spuling (Figur 4), og biofilmprøver blev skrabet fra bunden af beholderne efter spuling. Sediment blev optaget fra beholdernes bund med sterile 2 ml engangspipetter og opbevaret i syrevaskede og glødede blue cap flasker. Sediment til DNA analysering blev opbevaret i DNA-frie 50 ml Falcon rør.



Figur 4. Sediment på bunden af beholder 1 i få cm tilbageværende vand inden rensning af beholderen.

Biofilmskrab blev foretaget med sterile vatpinde på 2x2 cm, på 10 (beholder 1) eller 20 (beholder 2) vilkårlige steder på beholderens gulv. Vatpindene kom i syrevaskede og glødede 10 ml glas med 10 ml autoklaveret hanevand. Til DNA analyserne blev vatpindene opbevaret i 1,5 ml DNA-frie eppendorfrør med DNA-frit vand.

Prøvetagningstidspunkterne i forhold til nedtømning og opstart var ens i de to beholdere (Tabel 3).

Tabel 3. Prøvetagningsskema, der blev fulgt for både beholder 1 og 2.

	Formiddag	Eftermiddag
Dag 1	Vandprøve fra filter- og rentvandsafgang	Påbegynder tømning af beholder
Dag 2	Beholder tømmes helt	Sedimentprøve fra bunden af beholder
Dag 3	Rensning og inspektion	Biofilmskrab fra bund af beholder
Dag 4	Start opfyldning. Første prøver af rentvandsafgang udtages når det ønskede vandniveau er nået. Ved opstart af beholder 2 blev der desuden udtaget prøver af filterafgang umiddelbart efter at filtrene var sat i drift og fyldning af beholderen påbegyndt.	Prøver udtages med korte intervaller de første 5 timer
Dag 5	24 timers prøve udtages	
Dag 6	2 dages prøve udtages	
Dag 7		
Dag 8	4 dages prøve udtages	

4.3. Analyser

Følgende analyser blev udført på vand og sediment i Mikrobiologisk Klasse 1 laboratorium på DTU Miljø.

Karakterisering af bakteriesamfund

- Kimtal20 (R2A agar), kimal22 (gærekstrakt agar) og kimal37 (gærekstrakt agar)
- ATP bestemmelse
- Colilert®
- Enterolert®
- Pseudalert®
- PCR (polymerase chain reaction), kloning og 16S sekventering af bakterier i prøverne
- Online bakterie- og partikeltæller (prototype under udvikling afprøvet i beholder 2)

Karakterisering af vækstgrundlag

- Eftervækstpotentiale på R2A agar (henstandsforsøg med prøveudtagning på dag 0, 3 og 7)
- Kvantificering af NVOC
- Karakterisering af drikkevandssediment og biofilm

Øvrige parametre

- Turbiditet
- Verifikationsanalyser af positive Pseudalert® prøver (PCR og sekventering)

Kimtal ved 22 og 37° C: Kimtal22 og kimal37 blev udført i henhold til DS/EN/ISO 6222 på gærekstrakt agar ved pour plating i petriskåle med 1 ml prøve. Der blev lavet triplikater af hver fortynding (to til tre fortyndinger) baseret på ATP målingerne, der gav en indikation af bakteriekoncentrationerne indenfor få timer. Kimtal22 plader blev inkuberet i 72±4 timer ved 22 °C og kimal37 pladerne blev inkuberet i 48±4 timer ved 37 °C.

Kimtal ved 20° C: 50µl prøve blev spredt ud på R2A agar (Reasoner & Geldreich 1985) i petriskåle og inkuberet i 14 døgn ved 20 °C. Der blev lavet triplikater af hver fortynding.

ATP analyse: Prøverne blev analyseret for totalt og frit ATP på Advance Coupe instrument (luminometer) fra Celsis med LuminEX/LuminATE reagens-kit (Celsis No. 92687). ATP-koncentrationer blev bestemt ud fra en standardkurve i intervallet 0-100 pg ATP/ml med ATP standarder (Celsis No. 92588) fremstillet i sterilfiltreret autoklaveret postevand.

Hurtigmetoderne **Colilert®**, **Enterolert®** og **Pseudalert®** (Idexx) blev udført i henhold til producentens anvisninger. Der blev anvendt antifoam 100 ml glas og Quantitray2000 bakker. Colilert-bakkerne blev inkuberet ved 37 °C i 20±1 timer, Enterolert-bakker blev inkuberet ved 41 °C i 26±2 timer og Pseudalert-bakker blev inkuberet ved 37 °C i 26±2 timer.

Online bakterie- og partikeltæller: En prototype under udvikling (Grundfos) blev opsat efter prøvetagningsshanen i beholder 2, så den målte kontinuerligt på afgangsvandet med 10 minutters intervaller. Målinger fra sensoren blev pga. tekniske vanskeligheder først lagret efter tømning af beholderen.

Eftervækstpotentiale: 100 ml af alle vandprøver blev overført til syrevaskede og glødede redcap flasker, hvori de blev inkuberet ved 20 °C i syv dage. Efter 0, 3 og 7 dages henstand blev der udtaget 50 µl til pladespredning på R2A agar ifølge ovenstående beskrivelse.

NVOC (ikke flygtigt organisk kulstof) i vandet blev bestemt på en TOC-V wp Shimadzu efter tilsætning af 100 ml 17 % H₃PO₄ til 20 ml sample og filtrering (0,45 µm).

Tørstof i sediment blev afvejet efter opvarmning ved 105 °C i 20 timer og efterfølgende nedkøling i eksikator. Indhold af metaller blev bestemt på en Varian Vista MPX Axial View Inductively Coupled Plasma OES efter tilsætning af 7 M HNO₃, 80 °C sandbad (4 timer) og filtrering (0,45 µm). Indhold af TOC (total organisk kulstof) og IC (uorganisk kulstof) blev bestemt på LECO Induction Furnace CS-200 efter tilsætning af 5 % H₂SO₃ (til al karbonat var boblet af) og tørring ved 90 °C i 12 timer. Til bestemmelse af kvartsindhold anvendtes røntgen analyse (XRD) på Philips PW 1830 X-ray diffractometer med X-ray rør PW 2273/20, Philips (Cu K-alfa stråling, som danner røntgenstråler med en bølgelængde på 1.54051 Å).

DNA analyser: 0,8 – 1,2 liter vand, afhængigt af ATP-indhold, blev filtreret gennem membranfiltre med porestørrelse på 0,22 µm ved hjælp af en vacuum pumpe og glas"skorsten". Filtrene blev placeret i 1,5 ml eppendorfrør med 1 ml DNA/RNA-frit vand. Røret blev vortexet i 3 min. ved 2000 rpm. Derefter blev filteret fjernet fra røret, som blev centrifugeret ved 10.000 rpm. i 10 min. 950 µl supernatant blev fjernet, og pelleten i bunden af røret blev frosset ned ved -20 °C i det tilbageværende vand. Sediment og biofilmprøver blev frosset direkte i prøvetagningsrørene.

DNA blev ekstraheret fra cellerne ved skiftevis at koge cellerne i 100° C vandbad og fryse dem ved -80 °C. Dette blev gjort ad tre omgange. PCR (polymerase chain reaction) blev udført på Biometra T3000 ThermoCycler efter følgende protokol: Denaturering ved 92° C i 2 min, efterfulgt af 35 cykler på 30 sek. ved 92 °C, 30 sek. ved 55 °C og 2 sek. ved 72°C og en afsluttende forlængelses-reaktion i 10 min ved 72 °C. Derefter nedkøling ved 6 °C, indtil prøven blev udtaget.

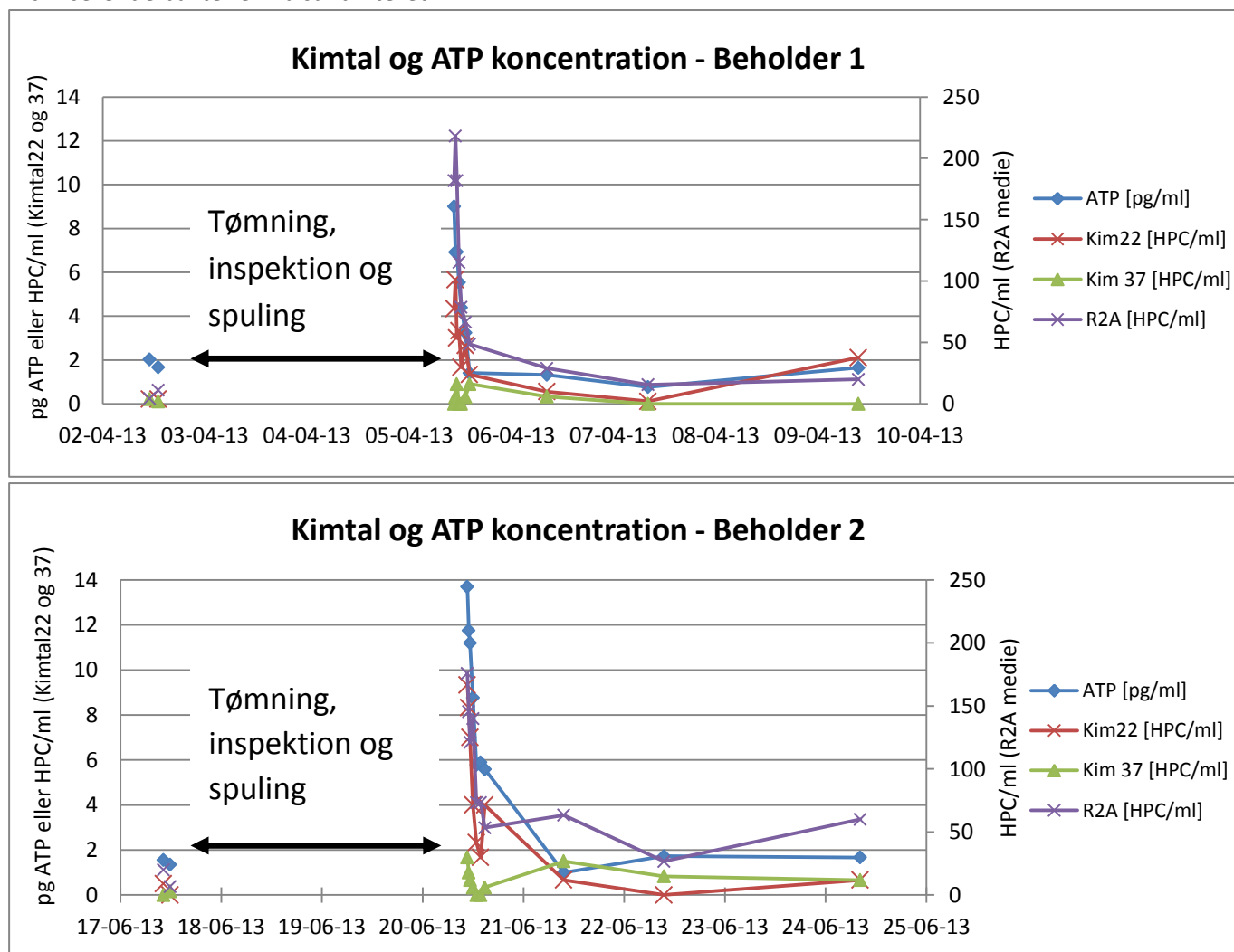
PCR mix (25 µl) bestod af 1 ng DNA template, 0,2 units Taq polymerase (D1806 Sigma, Taq DNA Polymerase fra *Thermus aquaticus*) med 10× PCR reaktions buffer med MgCl₂, 12.5 pmol af hver primer (27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' og 1492R, 5'-GGTACCTGTTACGACTT-3'), D7295 Sigma, Deoxynucleotide Mix, 10 mM, Molecular Biology Reagent samt W3513 Sigma, Water, BioPerformance Certified.

Mængden og kvaliteten af det oprensede PCR produkt blev testet på NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) ved en absorbans på 260/280 nm. PCR produkterne blev klonet i *E. coli* celler ved hjælp af TOPO vektorer ifølge protokollen i Bilag 3, således at der blev dyrket *E. coli* kolonier, som havde indsat et DNA-stykke fra bakterierne fra vores prøver. På den måde kunne DNA fragmenter fra de mange forskellige bakterier i prøven adskilles fra hinanden og sendes til sekventering i separate prøver. Sekventering blev foretaget af Macrogen. DNA sekvenserne blev analyseret med mothur v1.31 (Schloss et al. 2011).

5. Resultater

5.1. Bakteriemålinger

Der blev ikke målt overskridelser af grænseværdien for kimtal22 på noget tidspunkt i projektet (Figur 5). Umiddelbart efter idriftsætning målt kimtal22 værdier på max 10 CFU/ml i begge tanke. Koncentrationerne var faldet til <1 CFU/ml i begge tanke indenfor 24 timer. Over de følgende fire dage forblev målingerne på et lavt niveau. Kimtal37 værdier var lavere end 2 CFU/ml på alle tidspunkter. På R2A agar, der er bedre tilpasset drikkevandsbakterier end gærekstraktager, blev der målt kimtal20 værdier på ca. 200 CFU/ml ved idriftsætning af beholderne. Disse niveauer faldt ligesom for kimtal22 og kimtal37 i løbet af 24 timer, men var dog stadig på et svagt forhøjet niveau på dag 4 i forhold til niveauet inden rensning (~1 CFU/ml). De ikke dyrkbare bakterier blev inkluderet i undersøgelsen ved at måle ATP koncentration i vandet. Koncentrationen i afgangsvandet fra beholderne umiddelbart efter idriftsætning var forholdsvis høj sammenlignet med koncentrationen af dyrkbare bakterier. ATP koncentrationen er dog ikke direkte omsættelig til bakterietal, da store celler eksempelvis kan indeholde mere ATP end små celler. Høje ATP-koncentrationer kan betyde, at bakterier, der ikke normalt gror på de substrater, der findes i agar, er til stede i vandet, fx nitrificerende bakterier fra sandfilteret.



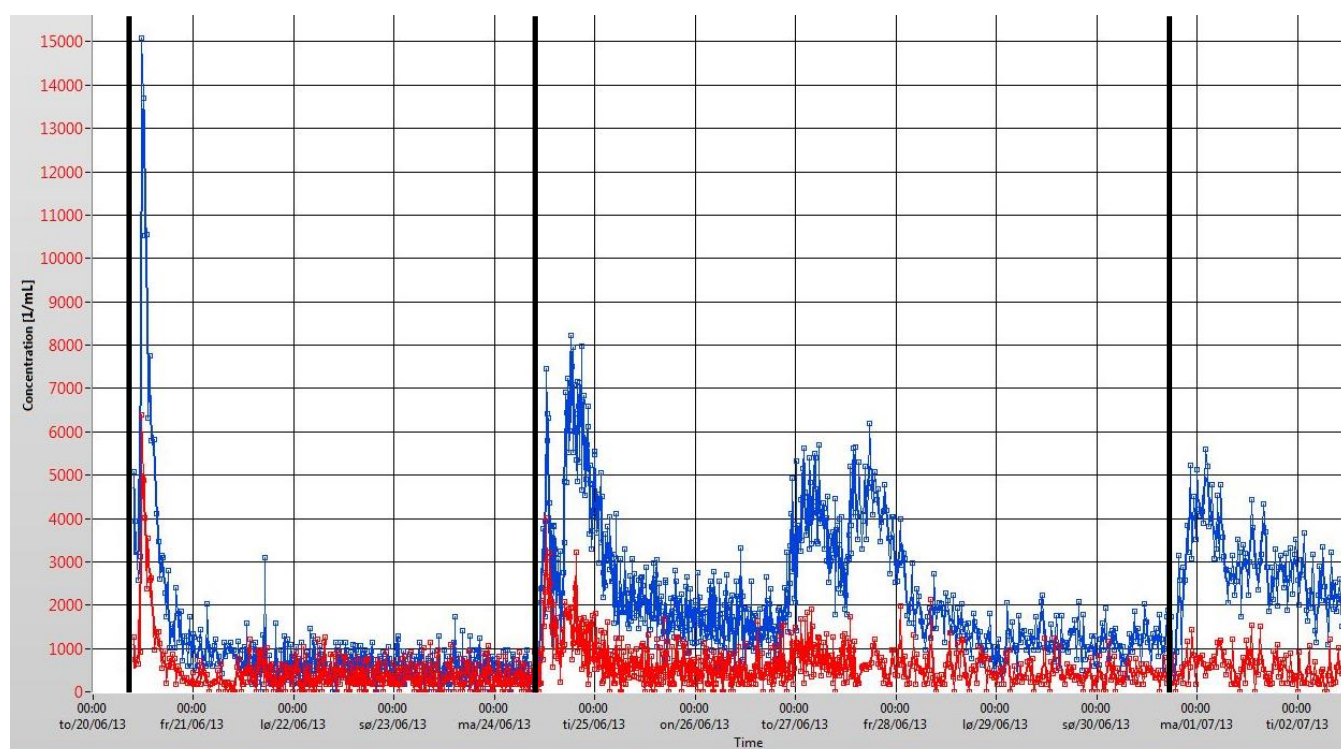
Figur 5. Koncentration af ATP samt bakterievækst på R2A agar (kimtal20) og gærekstrakt agar (kimtal22 og kimtal37) i afgangsvand fra beholder 1 og 2, Hovedværket, VandCenter Syd. Første prøve efter tømning blev taget da vandniveauet svarede til niveauet før nedtømning.

5.1.1. Fækale indikatorer og patogener

Der blev ikke påvist *Pseudomonas aeruginosa*, enterokokker, *E. coli* eller total coliforme bakterier (<1 pr. 100 ml prøve) på noget tidspunkt. Der blev observeret positivt signal i Pseudalert® analysen, men en DNA analyse viste, at der var tale om en falsk positiv prøve forårsaget af en anden bakterieslægt fra samme gruppe som *Pseudomonas* (gammaproteobakterier).

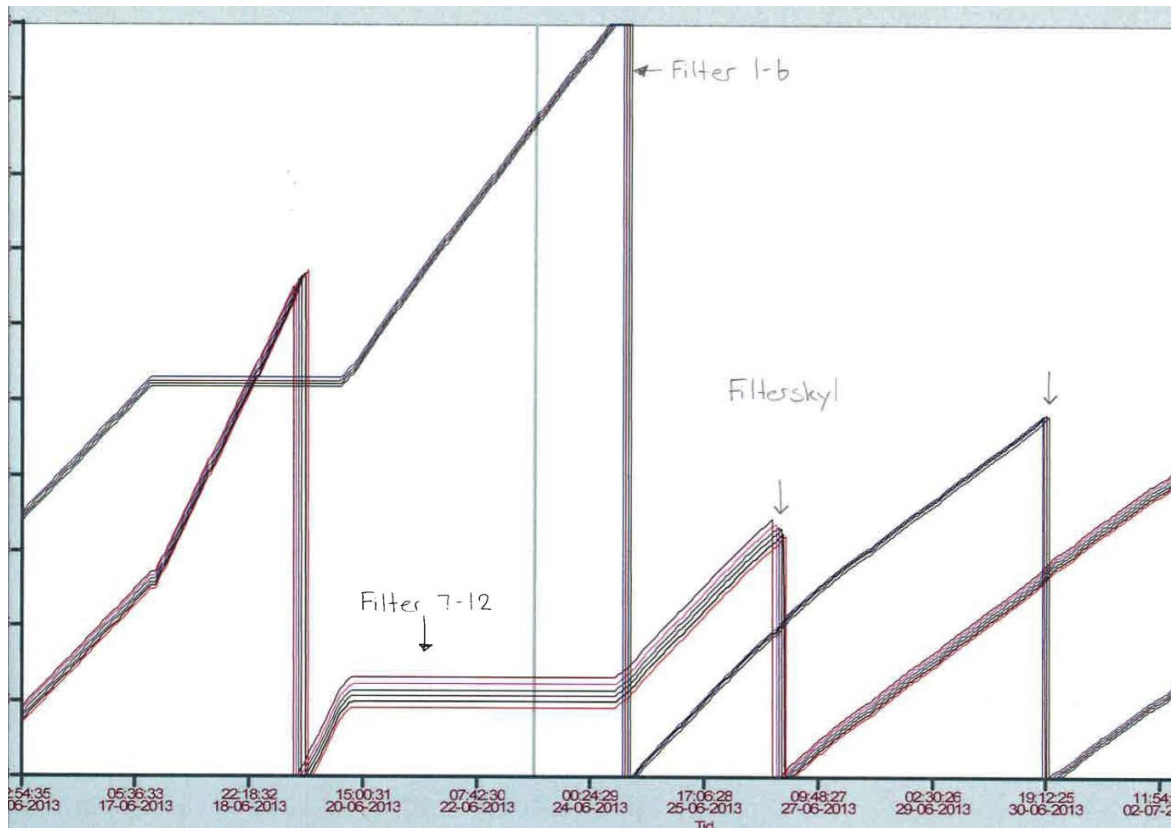
5.1.2. Online måling af total celletal

Ud over de veldokumenterede metoder, afprøvede vi en prototype på en online sensor under udvikling. Sensoren målte totale koncentrationer af bakterier og uorganiske partikler. Den højeste online sensor måling af bakterier og uorganiske partikler blev målt om eftermiddagen d. 20. juni (Figur 6) svarende til idriftsætning af beholder 2 (Figur 7). Ligesom for ATP og dyrkningsbaserede bakterieanalyser faldt koncentrationerne i løbet af kort tid og forblev på et lavt niveau indtil en ny hændelse.



Figur 6. Online målinger foretaget på afgangsvand fra beholder 2 med sensor prototype. Totale bakteriekoncentrationer er afbilledet i rød, mens koncentrationen af øvrige partikler er afbilledet i blå (de højeste toppe). Sorte linjer viser tidspunkt for opstart af beholder 2 (første linje) samt to returskyl af sandfilter 1-6, hvorfra vandet ledes til beholder 2.

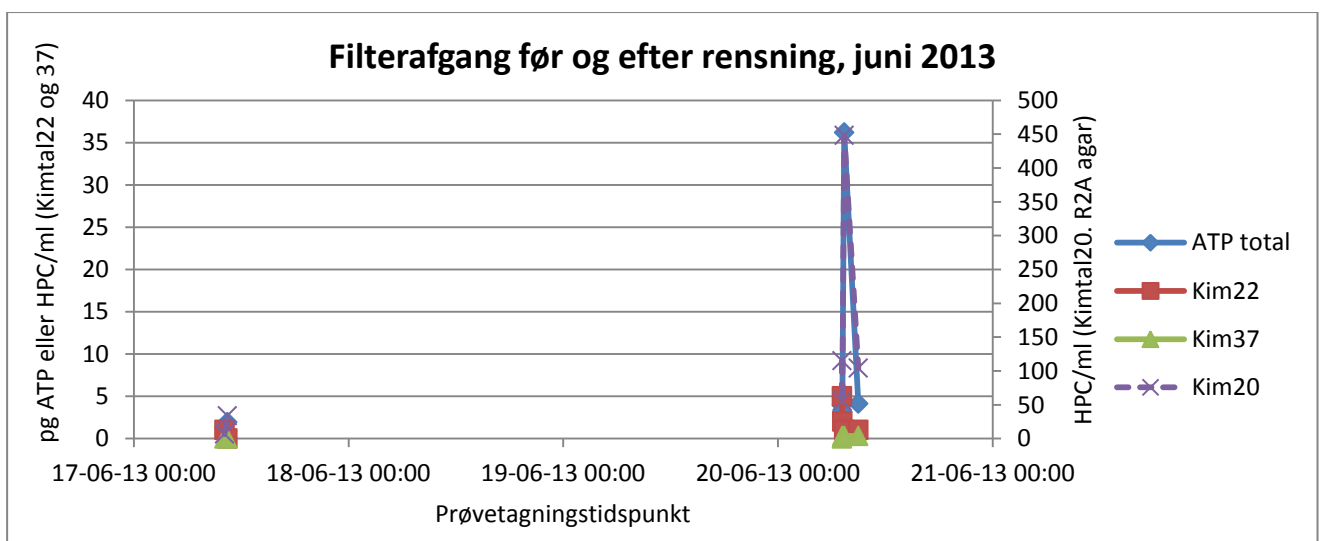
Sensoren målte desuden en stigning i koncentrationen af uorganiske partikler samt en mindre stigning i bakteriekoncentrationer i forbindelse med returskyl af filterserie 1-6 umiddelbart efter sidste prøvetagning d. 24. juni. Ved efterfølgende returskyl, natten efter d. 26. juni, blev der igen målt en stigning i uorganiske partikler men ikke i bakteriekoncentrationer. Natten mellem d. 27. og 28. juni blev der desuden målt forhøjede koncentrationer, som ikke skyldes tilbageskylning af filtre (Figur 7). Årsagen til målingen kendes ikke.



Figur 7. Oversigt over returskyl af begge filterserier. Filter 1-6 er forbundet til beholder 2, mens filter 7-12 producerer vand til beholder 1.

5.1.3. Afgangsvand fra filter

For at undersøge hvorvidt stilstand af filtrene under beholderrensning påvirkede den mikrobielle kvalitet af vandet, målte vi på afgangsvand fra filterserie øst (filter 1-6) før og efter rensning. Efter stilstand af filtret sås en svag stigning af kimtal20, kimtal22 og ATP. Udover den svage stigning, indeholdt en enkelt vandprøve høje koncentrationer af ATP og kimtal20 (Figur 8).



Figur 8. Koncentration af ATP samt bakterievækst på R2A agar (kimtal20) og gærestrakt agar (kimtal22 og kimtal37) i afgangsvand fra filterserie øst (1-6), Hovedværket, VandCenter Syd.

Der var ingen forskel på turbiditet i afgangsvandet fra filterserie øst (1-6) før og efter perioden med beholderrensning og stilstand af filteret. NVOC steg svagt fra et gennemsnit på 1,25 mg/l til 1,36 mg/l efter rensningen.

Vandet, der stod stille over filtersandet, blev ligeledes analyseret, efter driften havde været stoppet i to døgn. Som i afgangsvandet fra filtrene blev der ikke målt høje kimtal22 koncentrationer, mens ATP koncentrationen var over 10 pg/ml, hvilket er højt i forhold til normale værdier på 1-2 pg/ml. Derudover skal bemærkes, at 70 % af den målte ATP var frit ATP, hvilket typisk stammer fra læk fra døde celler.

En filterserie på seks filtre har et samlet volumen på ca. 230 m³, så vandvolumenet, der står stille i filtrene under beholderrensning svarer til halvdelen af volumenet i rentvandsbeholderen.

Tabel 4. Koncentration af ATP samt bakterievækst på R2A agar (kimtal20) og gærekstrakt agar (kimtal22 og kimtal37) i vand fra filter 1-6 (kompositprøve), Hovedværket, VCS. Vandet havde stået stille i to døgn over filtersandet, mens beholder 2 blev rensset.

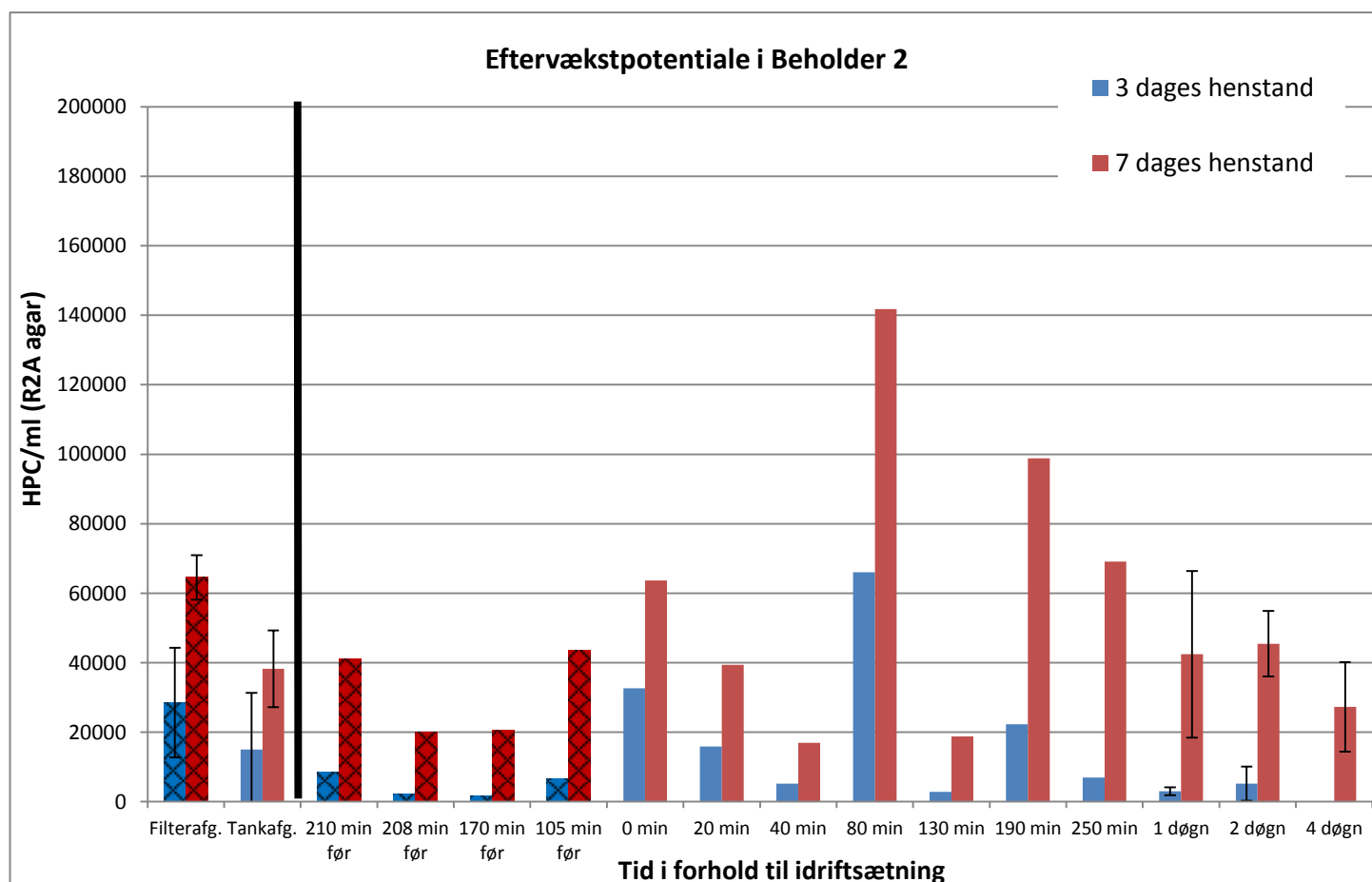
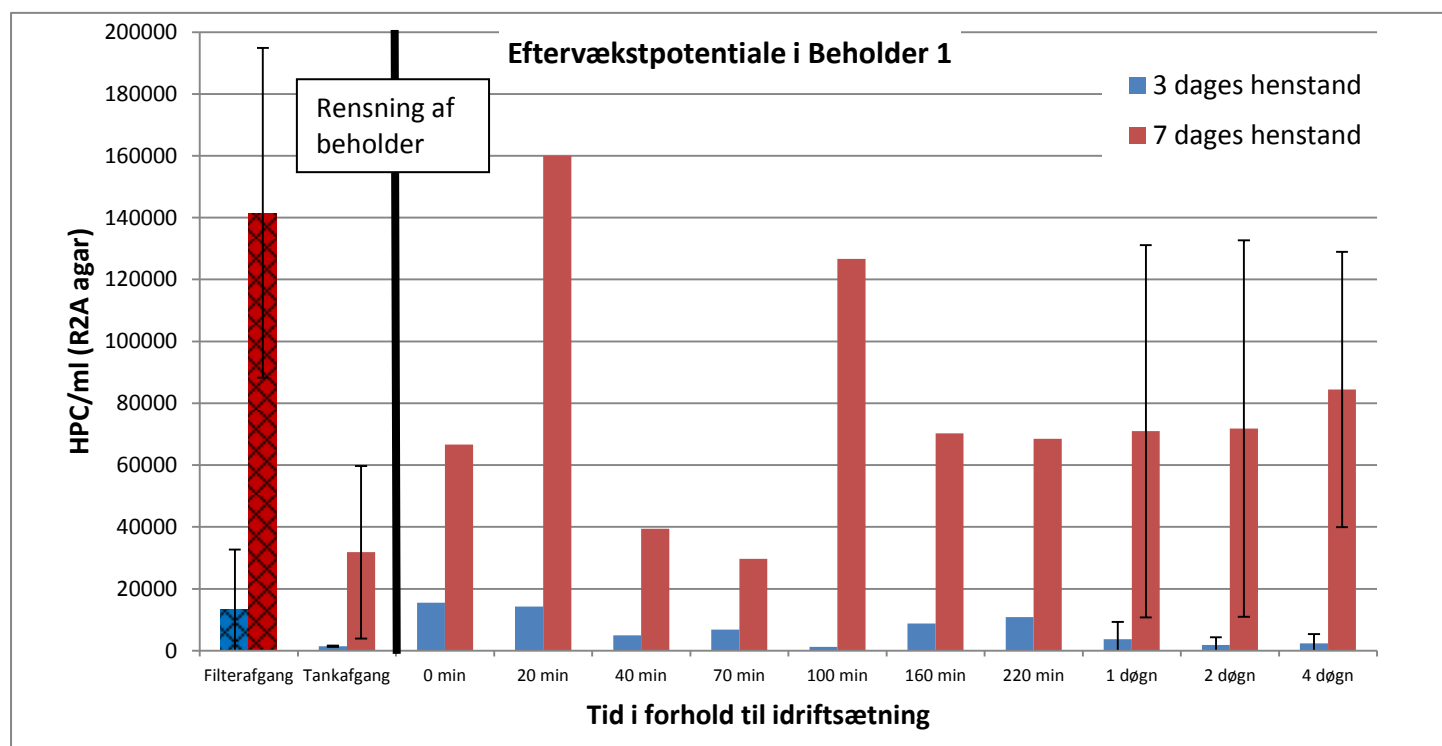
Topfiltervand	Kimtal22 [CFU/ml]	Kimtal37 [CFU/ml]	Kimtal20 [CFU/ml]	Total ATP pg ATP/ml	Frit ATP pg ATP/ml
	2	0	330	11,5	8,1

5.1.4. Eftervækstpotentiale

Eftervækstpotentialet i alle prøver blev målt ved at kvantificere tilvæksten af bakterier efter tre og syv dages henstand. Før beholderrensning var eftervækstpotentialet større i vand fra filterafgang end vand fra beholderafgang i begge beholdere (Figur 9). Der var intet tidsligt mønster i prøvernes eftervækstpotentiale efter beholderrensning, ligesom der var høje standardafvigelser. Dog var eftervækstpotentialet i vand fra beholderne generelt større efter beholderrensning end før (Tabel 5).

Tabel 5. Gennemsnitligt eftervækstpotentiale i vand fra beholderafgang før og efter beholderrensning målt som CFU/ml [R2A agar, 20°C, 14 dage] efter tre og syv dages henstand.

	Henstand [dage]	Koncentration før rensning [CFU/ml]	Koncentration efter rensning [CFU/ml]
Beholder 1	3	$1,4 \pm 0,2 \times 10^3$	$5,4 \pm 5,2 \times 10^3$
	7	$3,2 \pm 2,8 \times 10^4$	$7,8 \pm 4,6 \times 10^4$
Beholder 2	3	$1,5 \pm 1,6 \times 10^4$	$1,4 \pm 1,9 \times 10^4$
	7	$3,8 \pm 1,1 \times 10^4$	$5,2 \pm 3,6 \times 10^4$
Filterafgang øst	3	$2,9 \pm 1,6 \times 10^4$	$4,7 \pm 3,3 \times 10^3$
	7	$6,5 \pm 0,6 \times 10^4$	$3,1 \pm 1,3 \times 10^4$



Figur 9. Eftervækstpotentiale i vandprøver fra beholder 1 og 2 samt vand fra filterafgang (ternede søjler) efter henstand ved 20° C i tre og syv dage. Bakteriekoncentrationer er målt på R2A agar [20°C, 14 dage].

Eftervækstpotentiale baseres som oftest på målinger efter syv eller 14 dages henstand. Da vandet i VandCenter Syds distributionsnet meget sjældent ældre end tre dage, er målingen efter tre dage også relevant i dette studie.

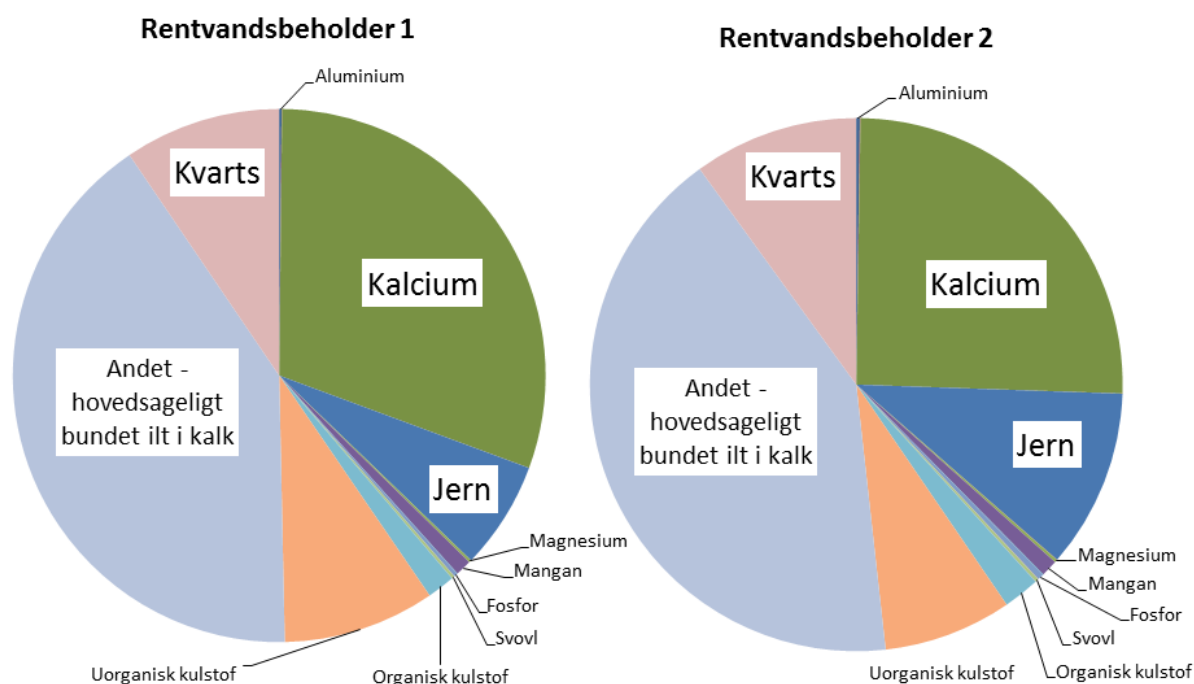
Højere eftervækstpotentiale efter rensning kan skyldes frigivet næring fra sediment og biofilm. Derudover tyder det også på, at det har betydning, hvor længe vandet opholder sig i enten beholdere eller filter. Ved normal drift er eftervækstpotentialet (der er højt, når vandet forlader filteret) opbrugt inden vandet forlader beholderen. Dette ændres under beholderrensning, da filteret står stille i flere dage under rensningen, og et fald i eftervækstpotentiale dermed allerede registreres i filteret (Figur 9, beholder 2).

5.1.5. Karakterisering af sediment og biofilm

Indholdet af tørstof i drikkevandssedimentet fra bunden af beholder 1 var 6,5 g/liter sedimentprøve. I beholder 2 var værdien på 8,3 g/liter. Forskellen skyldes blot forskellen af vandindhold i den opsamlede sedimentprøve. Der blev ikke målt signifikante forskelle mellem bakteriekoncentrationerne i sedimentet i de to rentvandsbeholdere (Tabel 6), ligesom indholdet af organiske og uorganiske stoffer var sammenlignelige (Figur 10 og Bilag 2).

Tabel 6. Bakteriekoncentrationer i drikkevandssediment. Kimtal20 er bestemt på R2A agar, og kimtal22 og kimtal37 er bestemt på gærestrakt agar. CFU = Kolonidannende enhed, DW=tørvægt.

	Tørt sediment	Beholder 1	Beholder 2	Vådt sediment	Beholder 1	Beholder 2
Kimtal22	CFU/g DW	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	CFU/ml	$7,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
Kimtal37	CFU/g DW	$<1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	CFU/ml	$<1,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^1$
Kimtal20	CFU/g DW	$4,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	CFU/ml	$2,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$
ATP total	pg/g DW	$7,0 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	pg/ml	$4,6 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$
ATP fri	pg/g DW	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	pg/ml	$7,6 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$



Figur 10. Karakterisering af sediment fra beholderne. Fordelingen er vist som masseandel af tørstof.

Tabel 7. Koncentration af ATP samt bakterievækst på R2A agar (kimtal20) og gærestrakt agar (kimtal22 og kimtal37) i biofilm fra gulvet i beholder 1 og 2, Hovedværket, VandCenter Syd.

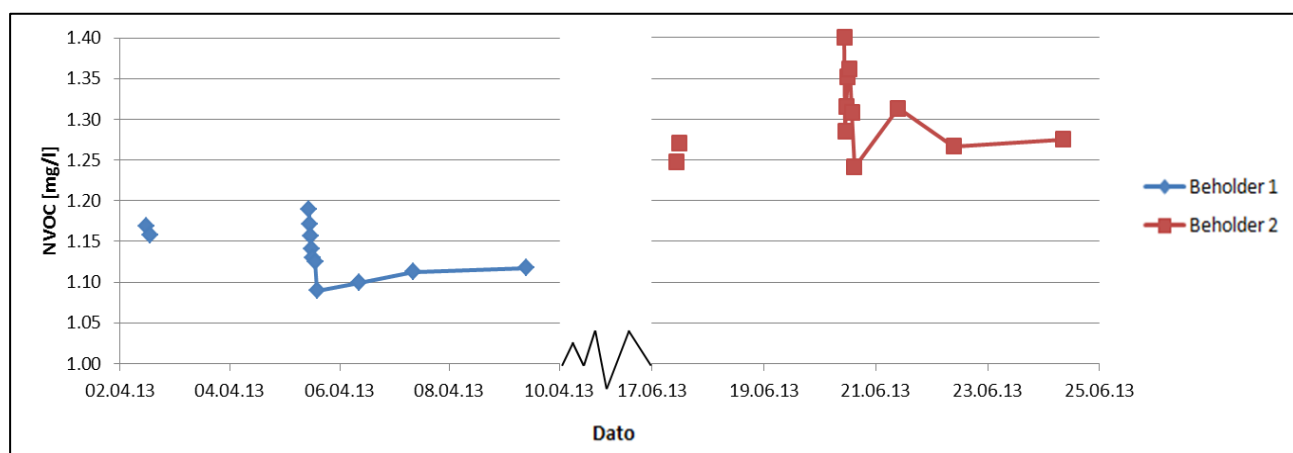
Biofilm fra gulv	Kimtal22 [CFU/cm ²]	Kimtal37 [CFU/cm ²]	Kimtal20 [CFU/cm ²]	Total ATP [pg ATP/cm ²]	Frit ATP [pg ATP/cm ²]
Beholder 1 (areal = 315 m ²)	22	2	192	174	154
Beholder 2 (areal = 552 m ²)	19	0	300	192	175

Kimtal22 værdierne i biofilmen svarer til ca. 0,1 (beholder 1) og 0,2 (beholder 2) CFU/ml vand i en beholder fyldt til niveauet ved prøvetagning efter fyldning antaget, at alle bakterier fra biofilmen blev fordelt ligeligt i vandfasen. De kan dermed ikke forklare den lille stigning i Kimtal22, der blev målt efter beholderrensning. I flere tilfælde kunne al vand dog ikke fjernes fra gulvet, hvorfor der lå et mindre volumen vand tilbage, hvori der kan være opslemmet sediment, der bidrager til de svagt forhøjede bakteriekoncentrationer. ATP indholdet i biofilmen udgjordes ligesom ATP indholdet i filtervandet hovedsageligt af frit ATP (% frit ATP), hvilket indikerer en stor andel af døde bakterier.

5.1.6. Turbiditet og NVOC (non volatil organisk kulstof)

Turbiditeten i vandprøverne var <1 FNU i alle vandprøver fra begge beholdere. Der var ikke signifikant forskel på turbiditeten før og efter nedtømning af beholderne.

Indholdet af ikke flygtigt kulstof (NVOC) blev svagt påvirket af beholderrensningerne (Figur 11). I beholder 1 faldt koncentrationen til under niveauet inden rensning i løbet af de første timer efter idriftsætning. I beholder 2 var koncentrationen forøget efter rensning men faldt ligesom i beholder 1 i løbet af de første timer efter idriftsætning.



Figur 11. Indhold af ikke flygtigt organisk kulstof i afgangsvand fra beholder 1 og 2, Hovedværket, VandCenter Syd.

5.1.7. DNA-analyser

De dominerende bakteriegrupper blev identificeret ved at analysere ribosomalt DNA fra ca. 10 bakterier fra hver prøve (Tabel 8). Dette giver en indikation af de bakterier, der er til stede i prøverne, men langt fra alle, da de totale bakterietal i prøverne er betydeligt højere. Der vil dog være størst sandsynlighed for at fange de bakterier, der er mest talrigt repræsenteret. Samlet blev der analyseret DNA fra 203 bakterier, hvoraf ingen var patogene bakterier.

Tabel 8. Oversigt over bakteriegrupper fra vand-, sediment- og biofilmprøver identificeret ved sekventering af 16S rRNA. De angivne værdier viser, hvor stor en andel af alle de identificerede bakterier fra hver lokalitet, der udgøres af de enkelte bakteriegrupper, udtrykt i %. Gul skravering markerer, at bakteriegruppen udgør 1-24 % af sekvenserne fra en bestemt lokalitet, orange markerer 25-75%. Samlet antal prøver er 203. Resultaterne er samlet for både beholder 1 og 2. "Filtre efter rens" blev dog kun udtaget i forbindelse med beholder 2.

		Før rens		Under rens		Filtre efter rens		Beholderafgang efter rens					
		Filterafgang	Beholderafgang	Sediment	Biofilm	Vand fra sandfiltertop	Filterafgang	0 min.	70-100 min.	250 min.	1 døgn	2 døgn	4 døgn
Række og klasse	Taxon/Antal prøver	20	13	24	14	4	8	21	28	7	28	13	23
Acidobakterier	Acidobacteria_Gr17							5	4				
	Acidobacteria_Gr22			4									
	Acidobacteria_Gr4			4									
	Acidobacteria_Gr6			17			13				4		
Aktinobakterier	Actinobacteria											8	
Bacteroidetes	Bacteroidetes	10			7							8	
Chloroflexi	Chloroflexi							5					
Nitrospirae	Nitrospira	5	8	29	21						11		9
Proteo- bakterier	Alfa-	Rhizobiales			7							8	
		Sphingomonadales											
		Uklassificerede	15	23				5	7		21		35
	Beta-	Burkholderiales								14		38	4
		Hydrogenophilales									4		
		Rhodocyclales						10	11				
		Uklassificerede			14		25	14	7				
	Delta-	Bdellovibrionales		8							4		
		Myxococcales		4				4					
		Uklassificerede									4		9
	Epsilon-	Campylobacterales					13	14	18	14	11		
	Gamma-	Enterobacteriales	10		36	75	13			29		23	
		Uklassificerede	5										
		Pseudomonadales			7								
		Xanthomonadales									4		
	Uklassificerede	Uklassificerede					13	5					
	Uklassificerede	Uklassificerede	5		8			5	4	14	4		9
Kendte men ej verificerede grupper	OD1	10	15					14	36		11		13
	OP11	5				25							
	TM7										4		
Uklassificerede	Uklassificerede	35	46	33	7		25	24	11	29	21	15	22

6. Konklusion

Der blev målt en svag stigning i kimtal efter beholderrensning, men koncentrationerne oversteg på intet tidspunkt 10 CFU/ml for kimtal22 og 2 CFU/ml for kimtal37. ATP indholdet i vandet steg efter beholderrensning. Tilsvarende forhøjede ATP koncentrationer blev målt i afgangsvandet fra sandfiltrene, efter filtrene havde stået stille i forbindelse med beholderrensning, hvilket indikerer, at der blev skyllet filterbakterier ind i beholderen. Indenfor 24 timer efter idriftsætning var både kimtal og ATP koncentrationer atter lave.

Der blev på intet tidspunkt påvist patogene bakterier i vand, sediment eller biofilm, hverken ved dyrkningsbaserede metoder eller DNA analyser.

De højeste koncentrationer af bakterier og tilgængeligt kulstof blev målt i sediment og biofilm fra bunden af beholderne samt i vand fra toppen af sandfiltrene. Ved spuling af tanken blev størstedelen af sedimentet fjernet, og der blev kun målt kimtal22 på gennemsnitligt 20 CFU/cm² gulv. Selv ved fuldstændig opblanding i beholderen efter fyldning vil dette kun forklare ca. 2 % af Kimtal22-stigningen i afgangsvandet. I flere tilfælde kunne al vand dog ikke fjernes fra gulvet, hvorfor der lå et mindre volumen vand tilbage, hvori der kan være opslemmet sediment, der bidrager til de svagt forhøjede bakteriekoncentrationer.

Vand fra sandfiltre havde kimtal22 værdier på ca. 5 CFU/ml efter beholderrensning og har dermed også bidraget til de svagt forhøjede koncentrationer i beholdervandet.

Der var et let forøget eftervækstpotentiale i vandet fra beholderne efter rensning i forhold til før rensning, hvilket kan medføre en øget vækst, hvis beholderen ikke idriftsættes umiddelbart efter opfyldning.

DNA analyser af de dominerende bakterier viste, at populationssammensætningen var forholdsvis stabil med de samme dominerende bakteriepopulationer før og efter rensning. Sammenholdt med påvisning af et øget vækstpotentiale efter rensning samt bakterier i filtervand, sediment og biofilm, der kan frigives ved rensning, peger dette på, at de svagt forhøjede bakteriekoncentrationer skyldes vækst af allerede tilstedeværende bakterier og ikke er blevet introduceret ved rensningen.

7. Anbefaling til procedure for inspektion og rensning af rentvandsbeholdere

Procedurer angående hygiejne og kontrolprøver er udarbejdet af VandCenter Syd (Bilag 1). I tillæg hertil beskriver vi i det følgende et anbefalet tidsmæssigt forløb, der bør følges ved beholdernedtømning, inspektion, rensning og idriftsætning for at minimere eftervækst:

Dag 1: Påbegynd nedtømning af beholder. Ventil lukkes ved fyraften, hvor der som regel vil stå lidt vand tilbage i beholderen

Dag 2: Beholderen pumpes helt tom med dykpumpe. Dette kan vare en fuld arbejdsdag.

Dag 3: Beholderen inspiceres og renses ved spuling

Dag 4: Opfyldning påbegyndes og beholderen idriftsættes, når beholderen er fyldt. Evt. udlignes der med vand fra sammenhængende beholder, hvis en sådan forefindes.

Hvis det er muligt, kan første volumen vand fra filtrene, der har stået stille, sendes retur til filteret eller til en anden filterserie. Således minimeres tilførslen af bakterier samt ophobning af jern, mangan, andre metaller, sand og lignende i rentvandsbeholderen.

8. Referencer

Drikkevandsbekendtgørelsen 2011. Bekendtgørelse nr. 1024 af 31/10/2011 om vandkvalitet og tilsyn med vandforsyningsanlæg.

Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J., & Allen, M.J. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection: Symposium Series Society for Applied Microbiology, v. 29, 106S–116S.

EU 1998. Rådets Direktiv 98/83/EF af 3. november 1998 om kvaliteten af drikkevand.

Miljøstyrelsen. 2005. Vejledning om håndtering af overskridelser af de mikrobiologiske drikkevandsparametre. Vejledning fra Miljøstyrelsen, nr. 4, 2005.

Reasoner, D.J. & Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1–7.

Schloss, P.D., Gevers, D. & Westcott, S.L. 2011. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE*, 6(12): e27310.

Bilag 1

Udarbejdet af Anne Esbjørn og Finn Møllerup, oktober 2013

Procedure ved beholderrensning og inspektion

I dette notat er beskrevet de procedurer, der skal følges, når VandCenter Syd foretager rensning og inspektion af rentvandsbeholdere og højdebeholdere. Beholderne bliver af VandCenter Syd betegnet som rød zone, hvor der er direkte kontakt med drikkevandet.

Adgang til beholder

Hvor der er adgang til beholderen fra det fri, skal der afdækkes med presenning rundt om nedgangsåbningen og der opsættes telt. Herved er der etableret skiftezone (midlertidig gul zone), hvor man tager hygiejnisk rigtigt udstyr på/med. Der rengøres for snavs og algevækst rundt om dæksel inden der åbnes til beholderen.

På vandværker eller højdebeholdere, hvor der er direkte adgang indefra afdækkes med plast på gulvet foran beholderen, så der etableres en skiftezone.

I den etablerede skiftezone opsættes der spande med henholdsvis Rodalon og vand, som anvendes til at desinficere fodtøj, hansker, udstyr mm.

Beklædning

I beholderen skal der altid anvendes desinficeret fodtøj specielt beregnet til formålet. Fodtøjets sål skal om muligt være jævn, så skidt ikke kan sætte sig fast. Skoene dyppes først i Rodalon og efterfølgende i rent vand inden man stiger ned/ind i beholderen.

I skiftezone ifører man sig engangsdragt eller desinficeret heldragt specielt beregnet til formålet. Forinden skal det almindelige arbejdstøj være rent.

I beholderen skal der altid anvendes desinficerede handsker specielt beregnet til formålet. Hanskerne dyppes først i Rodalon og derefter i rent vand umiddelbart inden man træder ned/ind i beholderen.

Håret afdækkes så vidt muligt af hættens på dragten og langt hår samles med elastik eller tilsvarende.

Anvendt udstyr

Det udstyr som medtaget i rød zone skal være desinficeret inden det tages med ind i beholderen. Engangsudstyr holdes i rent plastik indtil det kommer ind i skiftezone.

Fodtøj, værktøj, handsker og andet udstyr desinficeres på følgende måde:

- benytte rent udstyr
- skylle i en korrekt opløsning af Rodalon eller sprayes direkte med Rodalon eller et tilsvarende produkt
- skylle efter med rent vand

Adfærd i beholder

Under ophold i beholderen skal du være opmærksom på din adfærd, således at du minimerer risiko for forurening af drikkevandet. Har en medarbejder lige været syg eller er ved at blive det, skal vedkommende ikke komme ned i beholderen.

Rensning

Beholderen renses ved at bruge almindeligt tryk fra brandslange. Vægge og gulve spules rene og det overskydende vand pumpes op og ud til kloak.

Hvis beholderen ikke har det rigtige fald eller hvis der er lidt bundfald i beholderen, bruges kost eller svaber til at flytte bundfaldet hen til sugebrønden, hvor det pumpes ud af beholderen.

Idriftsætning

Beholderen sættes i drift og vandet pumpes ud til forbrugerne umiddelbart efter en rutinemæssig rensning og efterfølgende opfyldning af beholder. Der tages vandprøve efter 15 minutter og efter en gennemskylning af beholderen (eller 1 døgn) efter idriftsætning på rentvandsafgang.

Specielle forhold

Hvis du ikke kan efterkomme ovennævnte krav, udskyldes beholderen inden idriftsætning. Der udtages en vandprøve og beholderen tages ikke i drift, før der forelægger en acceptabel vandprøve, der overholder bekendtgørelsens krav. Ved reparationsarbejde eller hvor VandCenter Syd vurderer det relevant, kløres anlægget efter behov og der tages altid vandprøve inden idriftsætning og analyseresultatet skal overholde bekendtgørelsens krav i minimum to på hinanden følgende vandprøver.

Bilag 2

Karakterisering af sediment. Koncentrationerne er angivet som masseandel i tørstof.

Sediment	Rentvandsbeholder 1		Rentvandsbeholder 2	
	mg/kg	mg/g	mg/kg	mg/g
Al	1475.319	1.475319	2119.265	2.119265
As	287.9902	0.28799	445.969	0.445969
Ca	304525.6	304.5256	252767.9	252.7679
Cd	0.952966	0.000953	0.956095	0.000956
Cr	41.59054	0.041591	43.34357	0.043344
Cu	7.596508	0.007597	20.37796	0.020378
Fe	65598.44	65.59844	108630.4	108.6304
K	75.37127	0.075371	237.039	0.237039
Mg	1434.974	1.434974	1630.42	1.63042
Mn	9784.479	9.784479	10204.31	10.20431
Na	205.5321	0.205532	340.2895	0.34029
Ni	10.30596	0.010306	12.55411	0.012554
P	2276.384	2.276384	3671.95	3.67195
Pb	57.17538	0.057175	205.7257	0.205726
S	1780.963	1.780963	1946.574	1.946574
Zn	81.72797	0.081728	130.8733	0.130873
TOC		16.8		22.1
IC		92.2		77.9
Kvarts		95		100
Andet		408.3556		417.592

Der er herudover målt ikke kvantitativt K-feldtspar samt plagioclase i sedimentet.

Bilag 3

TOPO TA Cloning[®] Protocol

By: Akihiko Terada / Lene Kirstejn Jensen

Reagent:

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen[®], Cat. #: K4600-01):

Store TOPO TA Cloning[®] reagents (Containing pCR[®] II-TOPO[®], 10ng/μL Box1) at -80°C and One Shot[®]

Chemically Competent cells (TOP 10 cells, Box2) at -80°C

DNA template

Apparatus:

Thermocycler

Sterile microcentrifuge tubes

42°C water bath

37°C shaking and non-shaking incubator

Materials and their preparation

LB Broth:

1) Dissolve 10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 10 g NaCl in 950 mL deionized water.

2) Adjust the pH of the solution to 7.0 with NaOH and fill up to 1 L.

3) Autoclave the solution 121 °C for 15 min.

4) Store at 4°C.

LB agar: (3 plates for each cloning)

1) Dissolve 30 g in 1 litre distilled water and adjust the pH to 7,2.

2) Add 100 mL to each 250 mL Erlenmeier flask

3) Autoclave the solutions at 121 °C for 15 min.

4) Let the flask go to roomtemp.

5) Store flask at 4°C in the dark.

Antibiotic: 50 μg/mL Kanamycin: Add 1 μL stock solution to 1 mL (×1000 times dilution) 40 mg/ml X-gal in dimethylformamide (DMF)

1) Dissolve 100 mg X-Gal in 2,5 ml dimethylformamide. (Add directly to X-gal flask in)

2) Protect it from light by storing in a brown bottle at -20°C.

Procedure:

Preparation before starting: Equilibrate a water bath to 42°C.

Warm the vial of SOC medium to room temperature.

Warm up a flask with 100 mL LB-agar in micro-oven and then temperature at 50°C add 100 μL Kan. and pour plates.

Spread 40 μL of 40 mg/ml X-gal with spatula on each LB/Kan plate. Let the X-Gal diffuse into the agar for approximately 10 min.

Warm selective plates at 37°C for 30 min in incubator.

Set up TOPO TA Cloning[®] reaction

Add reagent to a 0,2 mL eppendorf tube (roomtemp.)

Note: The red color of the TOPO[®] vector solution is normal and is used to visualize the solution.

Table 1 TOPO[®] cloning reaction for chemically competent TOP10

Reagent	Volume
Sterile Water	1 μL (add to a total volume of 6 μl)
Salt Solution (1.2M NaCl; 0.06 M MgCl ₂)	1 μL
TOPO [®] vector	1 μL
Fresh PCR product	3 μL (0.5-4 μl)
Final Volume	6 μL

Tap gently for mixing.

Incubate for 30 min (5min or 30sec – 30 min) at room temperature (22-23°C).

For large PCR products (>1kb) or if you are using TOPO[®] Cloning, a pool of PCR products, increasing the reaction time will yield more colonies. The length of the TOPO[®] Cloning reaction can be varied from 30 sec to 30 min.

Place the reaction on ice and proceed to the One Shot[®] Chemical Transformation or freeze at -20°C overnight.

Transforming One shot[®] TOP10 competent Cells

Thaw on ice 1 vial of One Shot[®] cells for each transformation.

Add 2 µl of the TOPO[®] Cloning reaction into a vial of first spun One Shot[®] Chemically Competent *E. coli* and mix gently (tap). **Do not mix by pipetting up and down.** (Store the rest at -20°C).

Incubate on ice for 30 min (5 - 30 min)

Heat-shock the cells for 40 sec at 42 °C in thermocycler without shaking.

Immediately transfer the tubes to ice.

Add 250 µL of room temperature SOC medium.

Cap the tube tightly and shake the tube horizontally (104 rpm) at 37°C in the incubator for 1 hour.

Make a short spin down, remove 100 µL supernatant, mix the rest with a pipette and add the rest on a prewarmed selective plate with a spatula. To ensure even spreading of small volumes (10µL), add 20 µL of SOC in a microcentrifuge tube for each sample and put in the needed incubated transformation reaction solution for spreading. Mix with pipette. Then spread it onto plates with 10 µL, 50 µL, 50 µL, 75 µL, 100 µL and the remaining solution.

Incubate overnight at 37°C.

An efficient TOPO[®] Cloning reaction will produce hundreds of colonies. Pick white or light blue colonies for analysis. Do not pick dark blue colonies

Storage

Add 1 mL LB-broth/Kan in max 2 deep well plates per clone.

Inoculate white or light blue colonies and 1 dark blue (neg. control) with a stick of wood.

Place an adhesive plate seal on every deep well plate.

Incubate at 37 °C on shaker overnight.

Add 100 µL 50% Glycerol and 100µL inoculated culture to an Elisa plate.

Seal plates with parafilm.

Freeze Elisa plates at – 80°C.

Isolation of plasmid DNA using QIAprep spin Miniprep kit

Prepare 50 test tubes with 5 mL LB-broth/kan

Add 10 µL culture from deep well plate or inoculate from frozen Elisa plate

Incubate at 37°C on shaker (200 rpm) overnight

Pour culture to 2 mL eppendorf tube, centrifuge at 10000 rpm in 5 min

Discard supernatant, fill tube with more culture, centrifuge and discard supernatant.

Pellet can be frozen down (-20°C) to later use.

Follow the protocol.

Run the plasmids on a 1% agarosegel (compare with the neg. control from the blue colony) at 75 V in ½ hour (5µL + 1µL LB)

Freeze plasmids at -20°C